

121/02

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 30 328.2

Anmeldetag: 5. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Bruker Daltonik GmbH, Bremen/DE

Bezeichnung: Einweg-Probenträger für Massenspektrometrie

IPC: G 01 N, C 12 Q, C 12 M

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.


München, den 12. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Struktur der Probenträgerplatten für massenspektrometrische Analysen von Proben mit Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI).

Die Erfindung besteht darin, eine sehr ebene Unterstruktur aus mechanisch festem Material mit einer bündig aufliegenden Auflage aus Kunststoffmaterial konstanter Dicke zu kombinieren, so dass insgesamt eine Kompositplatte mit sehr ebener Oberfläche entsteht. Die preiswert herzustellende Kunststoffauflage ist nur einmal zu verwenden und hilft gegen Substanz-memory. Oberfläche und Material der Kunststoffauflage lassen sich hervorragend für MALDI optimieren. Die Kompositplatte hat vorzugsweise die Außenmaße einer Mikrotiterplatte.

10

 Abbildung 2

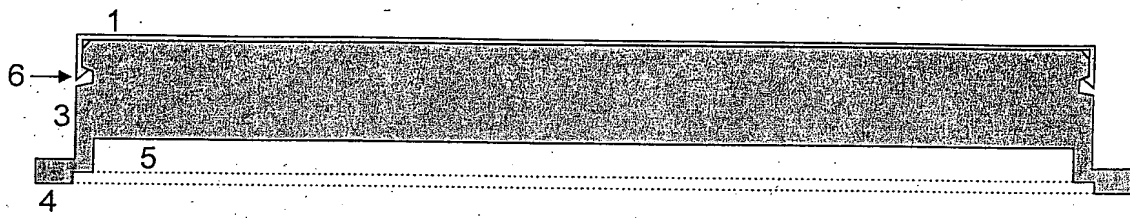


Abbildung 2

Einweg-Probenträger für Massenspektrometrie

Die Erfindung betrifft die Struktur der Probenträgerplatten für massenspektrometrische Analysen von Proben mit Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI).

Die Erfindung besteht darin, eine sehr ebene Unterstruktur aus mechanisch festem Material mit einer bündig aufliegenden Auflage aus Kunststoffmaterial konstanter Dicke zu kombinieren, so dass insgesamt eine Kompositplatte mit sehr ebener Oberfläche entsteht. Die Kunststoffauflage ist preiswert herzustellen. Oberfläche und Material der Kunststoffauflage lassen sich hervorragend für MALDI optimieren. Die Kompositplatte hat vorzugsweise die Außenmaße einer Mikrotiterplatte.

Stand der Technik

Für die Analyse von Biomolekülen hat sich die Massenspektrometrie mit Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption und Ionisierung (MALDI) als ein Standardverfahren etabliert. Meist werden dazu Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS = time-of-flight mass spectrometer) verwendet, aber auch Ionenzyklotron-Resonanzspektrometer oder Hochfrequenz-Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometer können hier eingesetzt werden.

Die Biomoleküle befinden sich in aller Regel in wässriger Lösung. Unter Biomolekülen sollen hier insbesondere Oligonukleotide (also das Genmaterial in seinen verschiedenen Ausformungen wie DNA oder RNA) und Proteine (also die wesentlichen Bausteine der lebenden Welt) verstanden werden, einschließlich ihrer besonderen Analoge und Konjugate, wie beispielsweise Glycoproteine oder Lipoproteine. Die Ionisierung durch MALDI lässt sich aber auch auf technische Polymere und kleine organische Verbindungen anwenden. Die Moleküle unter Analyse werden im Folgenden als Proben- oder Analytmoleküle bezeichnet.

Die Auswahl der Matrixsubstanz für den MALDI Prozess hängt von der Art der Biomoleküle ab; es sind inzwischen weit über hundert verschiedene Matrixsubstanzen mit verschiedenartigen Meriten bekannt geworden. Die Matrixsubstanz muss insbesondere absorptiv für das Licht der verwendeten Laserwellenlänge sein; sie hat darüberhinaus die Aufgabe, die Probenmoleküle in geeigneter Weise voneinander zu isolieren, sie intakt in die Gasphase zu bringen (Desorption) und sie zu ionisieren (meist durch Protonierung oder Deprotonierung). Für diese Aufgabe hat es sich als günstig erwiesen, die Analytmoleküle in irgendeiner Art in die zumeist kristallinen Matrices bei deren Kristallisation auf der Probenträgeroberfläche oder zumindest in die Grenzflächen zwischen den bei der Kristallisation entstehenden Kriställchen einzubauen. Die Matrixmoleküle haben einen 10^3 - bis 10^5 -fachen Überschuss gegenüber den Analytmolekülen.

Für das Auftragen von Probe und Matrix sind eine Reihe verschiedener Methoden bekannt geworden. Die einfachste davon ist das Aufpipettieren einer Lösung mit Probe und Matrix auf

einen gereinigten, metallischen Probenträger. Der Lösungstropfen bildet auf der Metalloberfläche eine Benetzungsfläche, deren Durchmesser von der Benetzbarkeit der Metalloberfläche durch das jeweils verwendete Lösungsmittel abhängt. Es bildet sich dabei nach dem Auftrocknen der Lösung ein Probenfleck aus kleinen Matrixkriställchen in der Größe dieser Benetzungsfläche, wobei sich in der Regel aber keine gleichmäßige Belegung der Benetzungsfläche zeigt. Die Kriställchen befinden sich bei vielen Matrixsubstanzen am Rand des Probenflecks; es gibt hier so genannte „hot spots“ hoher Empfindlichkeit, die aber als solche ohne Ausprobieren nicht erkennbar sind.

Für Matrixsubstanzen, die sich nur sehr schwer oder gar nicht in Wasser lösen, wie beispielsweise α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, hat es sich als günstig erwiesen, eine sehr dünne Schicht der Kristalle auf der Oberfläche vor dem Aufbringen der wässrigen Analytlösungen zu erzeugen, beispielsweise durch Aufbringen einer Lösung der Matrixsubstanz in Aceton. Hier gibt es eine gleichmäßigere Empfindlichkeit über die Fläche der Auftragung.

Aus der Patentschrift DE 197 54 978 C1 (GB 2 332 273, US 6,287,872) ist eine verbesserte Methode des Probenauftrags bekannt geworden, die darin besteht, die Proben auf kleine benetzungsfreundliche (hydrophile) Ankerbereiche in einer benetzungsfeindlichen (hydrophoben) Umgebung aufzubringen. Aufpipettierte Tröpfchen mit gelöster Matrix und gelösten Analytmolekülen hängen sich an diese Ankerbereiche an und kristallisieren dort viel gleichmäßiger als ohne Anker. Die Kristallkonglomerate binden dabei in diesen hydrophilen Ankerbereichen recht fest an die Oberfläche des Probenträgers. Bei sorgfältiger Präparation lässt sich eine reproduzierbar gleichmäßige Empfindlichkeit erreichen. Auch hier ist die Belegung mit Matrixsubstanzen vor dem Aufbringen der Probenlösungen möglich.

Alle diese Verfahren zum Aufbringen der Proben und deren Einbau in Matrixkriställchen hängen aber sehr stark von den Eigenschaften der Oberfläche, besonders auch von den Eigenschaften der hydrophilen Ankerflächen ab. Zu diesen Eigenschaften gehören die chemische Zusammensetzung des Trägers an seiner Oberfläche, der Oxidationszustand der Oberfläche, die Glattheit und insbesondere die Benetzungseigenschaften der Oberfläche in Kombination mit dem eingesetzten Lösungsmittel. Von besonderer Bedeutung ist eine extreme Sauberkeit der Oberfläche, da der MALDI-Prozess schon durch geringste Spuren von Verunreinigungen empfindlich gestört werden kann. Insbesondere dürfen keine Alkaliionen aus der Oberfläche in die gelöst aufgebrachte Probe austreten. Für die in der Regel metallischen Oberflächen der Probenträger lässt sich eine reproduzierbar hergestellte Oberflächenstruktur mit vorgegebenen Eigenschaften nur schwer erreichen.

Werden Flugzeitmassenspektrometer für die Analyse eingesetzt, so kommt auf die Probenträgeroberflächen auch noch die Forderung nach außerordentlicher Ebenheit hinzu. Die Verwindung der Oberfläche darf einige Mikrometer nicht überschreiten, da sonst die präzise Massenbestimmung, für die heute Genauigkeiten von wenigen ppm (parts per million; Millionstel der Masse) gefordert werden, aus den Flugzeiten wegen der verschiedenen Fluglängen erschwert

wird. Bei einem Meter Fluglänge entspricht eine Flugbahnverlängerung um ein Mikrometer bereits einer Flugzeitverlängerung um größenordnungsmäßig ein Millionstel und einer scheinbaren Massenvergrößerung von zwei Millionsteln.

Es haben sich bisher nur wenige Arten von Probenträgermaterialien als einigermaßen

- 5 universal benutzbar herausgestellt. Dazu gehören insbesondere (1) glattgewalztes, in besonderen Glühverfahren hergestelltes etwa drei Millimeter starkes Edelstahlblech mit geschliffener oder polierter Oberfläche, (2) elektrisch leitend beschichtete Glasplatten, (3) mit Nickel oder Gold beschichtete Aluminiumplatten und (4) Siliziumwaferplatten. Da die Oberflächenbeschaffenheit von kritischer Bedeutung für die Kristallisation der Matrix ist und andererseits –
10 je nach Anwendung- unterschiedliche Matrices zum Einsatz kommen, werden in der Praxis applikationsabhängig verschiedene Probenträgerplatten bevorzugt.

Für den automatisierten Umgang mit Probenträgerplatten ist es günstig, die als Industriestandard bekanntgewordene Form von Mikrotiterplatten auch für die Probenträgerplatten einzuhalten. Nur Probenträgerplatten in der ungefähren Form von Mikrotiterplatten können von
15 handelsüblichen Pipettierrobotern ver- und bearbeitet werden. Die Platten können von standardisierten Greifern gegriffen und mit Hilfe von Vielfachpipettenköpfen mit Probentropfen belegt werden. Sie können in „Plattenhotels“ gestapelt oder schubladenförmig in entsprechende Magazine eingeschoben werden. Die Form der Unterseite der Mikrotiterplatten wirkt beim Stapeln als relativ dichter, zumindest staubschützender Deckel für die darunterlie-
20 gende Platte.

Die Probenträgerplatten können mit Barcodes an der Stirnfläche oder auf der Oberseite versehen sein. Die Barcodes können von einigen Industrierobotern gelesen werden. Es ist jedoch schwierig, einen vakuum- und waschfesten Barcode-Aufdruck zu entwickeln. Es wurden daher Probenträgerplatten mit vakuum- und waschfesten Transpondern entwickelt, deren Code gelesen werden kann; es ist sogar ein teilweises Beschreiben der Transponder mit
25

Mikrometern auf größeren Flächen können nicht einfach erreicht oder nicht langzeitstabil erhalten werden.

Die preiswerte Herstellung von MALDI-Probenträgerplatten ist aber immer noch erstrebenswert. Insbesondere bei Anwendungen, bei denen es auf höchste Nachweisempfindlichkeit

5 ankommt, ganz sicher aber für diagnostische Anwendungen, kann bei wiederverwendbaren Probenträgern der sog. Memoryeffekt die Messergebnisse negativ beeinflussen, denn vielfach lassen sich die aufgetragenen Analytmoleküle auch durch sorgfältiges Waschen nicht quantitativ entfernen. Außerdem wird immer stärker eine industrielle Vorbelegung der Probenorte mit geprüften Matrixsubstanzen garantierter Reinheit und Funktion gewünscht.

10 Aber auch weitergehende Schritte der Probenpräparation auf Probenträgerplatten wie enzymatischer Verdau, Reinigen der Probensubstanzen oder Markierungen rücken näher und fordern einmalig verwendbare, preiswerte Probenträgerplatten.

Aufgabe der Erfindung

Es ist die Aufgabe der Erfindung, einmalig verwendbare und preiswert herzustellende
15 MALDI-Probenträger mit höchster Oberflächenebenheit im Bereich weniger Mikrometer zu finden. Die Probenträger sollen leicht zu handhaben sein. Es soll möglich sein, die Probenträger mit Matrixsubstanzen oder anderen Oberflächenbelegungen so vorzufertigen, dass sie versandt werden können und vom Benutzer ohne weitere Vorbereitungen verwendet werden können.

Kurze Beschreibung der Erfindung

Es ist der Grundgedanke der Erfindung, die Probenträger als Kompositstruktur mit einer wiederverwendbaren Unterstruktur aus einem mechanisch sehr festen Material höchster Maßgenauigkeit und einer einmalig zu verwendenden Auflage aus Kunststoff auszubilden. Die Unterstruktur kann beispielsweise aus Edelstahl gefertigt sein, mit einer solch eben gestalteten Oberfläche und Maßhaltigkeit, wie es für MALDI-Probenträger erforderlich ist. Die Einweg-Auflage ist eine aus relativ dünnem Kunststoffmaterial in sehr gleichmäßiger Dicke gefertigte Platte, die so aufgebracht wird, dass sie auf der Unterstruktur großflächig bündig aufliegt. Die Herstellung von Platten einer gleichmäßigen Dicke mit Toleranzen von nur wenigen Mikrometern ist heute großtechnisch möglich, beispielsweise durch Spritz-
30 guss.

Das bündige Aufliegen kann durch verschiedenartige Maßnahmen erreicht werden. Beispielsweise kann eine Vielzahl von Noppen an der Plastikplatte in eine Vielzahl von hinterfrästen Löchern oder Nuten in der Unterstruktur hineingedrückt werden. Günstiger erscheint jedoch eine leicht konkave Ausführung einer unterseitig glatten Platte, die am Rande fest auf
35 die Unterstruktur aufgedrückt wird, wodurch sie durch ihre Elastizität großflächig bündig aufliegt. Dabei muss jedoch ein Überschnappen vermieden werden. Der Halt am Rande kann durch einen gesonderten Rahmen, der an der Unterstruktur festgemacht wird, gegeben werden,

aber auch durch einen Halterand der Plastikplatte in Form einer geschlossen oder durchbrochen umlaufenden Randleiste, die in entsprechende Rillen oder Nuten greift. Die Nuten können sich auf der Oberfläche der Unterstruktur befinden oder vorzugsweise in deren Stirn- und Seitenflächen. Die genaue Form der Randleiste hängt von der Härte und der Elastizität der Kunststoffauflage ab.

Eine umlaufende, geschlossene Randleiste an der Kunststoffplatte, die die Randkante der Unterstruktur umfasst und sich hier in einer Nute festhält, kann auch einer etwas weichen Kunststoffplatte bereits ohne Unterstruktur eine erhöhte Stabilität geben, wie sie für Versand und Handhabung von Vorteil ist. Bei härteren Kunststoffmaterialien kann eine in einzelne elastische Zungen aufgeteilte Randleiste verwendet werden.

Die Unterstruktur kann Durchbohrungen und gegebenenfalls feinste Rillen auf der Oberfläche tragen, um eine gute Evakuierung des Raums zwischen Kunststoffauflage und Unterstruktur zu gewährleisten.

Unterstruktur wie auch Kunststoffauflage können maschinenlesbaren Code tragen, etwa durch aufgedruckten Barcode oder Punktcod. Die Unterstruktur kann insbesondere einen fest eingebauten Transponder tragen, dessen Code von entsprechenden Lesestationen in Pipettierrobotern und Massenspektrometern über Entfernungen von einigen Zentimetern hinweg berührungslos gelesen werden kann. Dieser Code im Transponder kann einen unveränderlichen Teilcode enthalten, der den Probenräger unlöschar kennzeichnet, und einen veränderlichen Teilcode, der probenträgerbezogene Daten, den aktuellen Belegungs- und Abarbeitungsstatus des Probenrägers und Zeiger auf Dateien mit Daten zur Ablaufsteuerung der probenbezogenen Analysenverfahren enthalten kann.

Eine Vorrichtung zur Befestigung der Kunststoffauflage auf die Unterstruktur kann gleichzeitig auch den Code der Kunststoffauflage in den Transponder übertragen. Es entfällt dann der Zwang, gesonderte Lesestationen für diesen Code der Kunststoffauflage in allen Geräten zu haben.

Enthält die Kunststoffauflage keine eigene Kennung, so besteht ein Zwang zu einer einmaligen Verwendung, wenn die Vorschriften der „Good Laboratory Practice“ (GLP) eingehalten werden sollen. Die einmalige Verwendbarkeit kann durch eine besondere Ausformung der Kunststoffauflage erzwungen werden, beispielsweise durch das erzwungene Abbrechen eines wichtigen Teils beim Abnehmen von der Unterstruktur oder durch eine andere Art der Zerstörung oder Knickung der Auflage.

Durch die mechanische Stabilität der Unterstruktur und eine entsprechende Elastizität der Auflage muss sichergestellt werden, dass leichte thermische Belastungen keine Durchbiegung der Gesamtstruktur bewirken, die über wenige Mikrometer hinausgehen.

Die Unterstruktur kann als Hohlkasten, aber auch als vollflächige Platte ausgebildet werden. Ihre Bodenstruktur kann wieder als guter Deckel für einen darunterliegenden Probenräger

10 dienen. Die Unterstruktur kann an ihrem Rand weiterhin besondere Löcher oder Nuten für ein kraftschlüssiges Greifen durch Roboter enthalten. Auch Nuten für ein Einziehen in das Vakuumsystem des Massenspektrometers können hier untergebracht werden. Ferner kann hier eine Struktur für den Ansatz eines Abwerfers für die Kunststoffauflage vorhanden sein, 5 beispielsweise ein Loch für den Einschub eines Exzenterwerkzeugs, das durch Drehen die Kunststoffauflage aus den Haltenuten drückt und absprengt. Es kann auch die Unterstruktur selbst mit einem System, beispielsweise einem Hebelsystem, zum Abdrücken der Kunststoffauflage versehen sein.

10 Die Kunststoffauflage kann aus elektrisch leitfähigem Material gefertigt oder oberflächlich metallisiert sein, um das Beschleunigungspotential der im MALDI-Prozess gebildeten Ionen gut zu definieren.

Die Gesamtstruktur der Kompositeinheit kann vorzugsweise genau den Außenmaßen einer Mikrotiterplatte entsprechen. Die Kompositeinheit kann dann leicht von handelsüblichen Robotern gehandhabt werden.

15 Die Kunststoffauflage kann insbesondere ein Raster mit hydrophilen Ankern in hydrophober Umgebung tragen. Optisch erkennbare Markierungen, die in festem Abstand zum Raster angeordnet sind, können als Orientierungspunkte dienen, um die Proben genau in den Ort des Laserfokus zu bewegen.

20 Die Kunststoffauflagen können bereits vorgefertigt mit Matrixsubstanzen auf den künftigen Probenorten versehen sein. Die Kunststoffauflage kann auch Orte enthalten, die gezielt chemisch funktionalisiert wurden (z.B. durch Affinitätssorbens, C18 oder Ionenaustauscher). Die Funktionalisierung kann entweder auf den zukünftigen Probenorten oder auf beliebigen anderen Orten auf dem Probenträger aufgebracht sein, auf denen die Analyttropfen temporär prozessiert werden.

25 Eine Hydrophobisierung der Kunststoffoberfläche kann durch oberflächliche Perfluorierung erzeugt werden. Es gibt jedoch auch andere Arten der Hydrophobisierung, beispielsweise durch Aufbringen und Einbrennen von Perfluoroalkansilikaten.

Besonders preisgünstig wird die Herstellung hydrophober Kunststoffprobenträger mit hydrophilen Ankerflächen dann, wenn ein Kunststoff mit hinreichender Hydrophobizität 30 verwendet wird (dann wird eine zusätzliche Hydrophobierung überflüssig) oder wenn die Matrixaufträge selber als hydrophile Anker dienen.

Für solche Probenträger kann die einmalige Verwendbarkeit auch dadurch sichergestellt werden, dass der Matrixauftrag, die Hydrophobschicht, die Metallisierungsschicht oder eine andere kritische Oberflächeneigenschaft beim Waschen irreversibel geschädigt oder entfernt 35 wird.

Beschreibung der Bilder

Abbildung 1 stellt die Kunststoffauflage (1) vor dem Aufbringen dar. Sie ist leicht konkav gekrümmt.

Abbildung 2 zeigt eine Kompositprobenträgerplatte mit der nunmehr ebenen Kunststoffauflage (1) auf einer Unterstruktur (3) mit Fuß (4) und einem Boden (5), der als Deckel für darunterliegende Probenträger ausgebildet ist. An der Stelle (6) greift die Randleiste in eine Nut der Seitenwand der Unterstruktur (3) ein.

Abbildung 3 gibt eine Kompositplatte in Form einer Mikrotiterplatte wieder. Die Kunststoffauflage (1) greift mit Zungen (2) in eine Nut der Unterstruktur (3) ein. Die Unterstruktur enthält hier einen Barcode-Aufdruck (7), einen eingeklebten Transponder (8) und eine Vertiefung (9) zum Greifen für Roboterarme. Auf der Kunststoffauflage (1) befinden sich die Probenorte (10), die bereits mit Matrixsubstanz vorbelegt sein können.

Besonders günstige Ausführungsformen

Eine besonders günstige Ausführungsform der Erfindung ist in den Abbildungen 1 bis 3 wiedergegeben. Der Probenträger ist als Kompositstruktur ausgeführt, mit einer wiederverwendbaren Unterstruktur (3) aus einem mechanisch sehr festen Material höchster Maßgenauigkeit wie beispielsweise Edelstahl, Hartaluminium oder Titan, und einer einmalig zu verwendenden Auflage (1) aus einem elektrisch leitenden Spritzguss-Kunststoff. Eine Unterstruktur (3) aus Edelstahl kann, wenn auch nur mit einiger Kunst und Kenntnis, mit einer solch ebenen Oberfläche und einer solchen Maßhaltigkeit gefertigt werden, wie es für MALDI-Probenträger erforderlich ist. Die Einweg-Auflage (1) ist aus relativ dünnem Kunststoffmaterial gefertigt und besitzt im aufliegenden Plattenteil eine sehr gleichmäßige Dicke. Sie wird so aufgebracht, dass sie auf der Unterstruktur großflächig bündig aufliegt und so nach außen die Präzision der Edelstahloberfläche wiedergibt. Die Herstellung von Plastikplatten einer gleichmäßigen Dicke mit Toleranzen von nur wenigen Mikrometern ist heute großtechnisch sehr preiswert möglich. Es ist ebenfalls möglich, die Kunststoffauflage (1) sehr reproduzierbar mit gewünschten Texturen zu versehen, sie oberflächlich zu metallisieren, sie zu hydrophobisieren oder sonst mit gewünschten Eigenschaften zu versehen.

Die Kompositstruktur hat in diesem Beispiel die Größe und Form einer Mikrotiterplatte.

Wenn die Kompositeinheit genau den Außenmaßen einer Mikrotiterplatte entspricht, kann sie leicht von handelsüblichen Robotern gehandhabt werden. Es sind natürlich auch andere Formen denkbar, wie sie beispielsweise für kommerzielle Massenspektrometer entwickelt wurden.

Das bündige Aufliegen wird in diesem Beispiel durch eine leicht konkave Ausführung des aufliegenden Teils der elastischen Kunststoffplatte erzeugt, wie in Abbildung 1 gezeigt. Die Durchbiegung der Platte beträgt im spannungsfreien Zustand weniger als einen halben Millimeter. Die Kunststoffauflage wird am Rande fest auf die Unterstruktur aufgedrückt,

wodurch die Plastikplatte durch ihre Elastizität großflächig bündig aufliegt. Durch eine aus Erfahrung festgelegte oder experimentell ermittelte Formgebung wird ein Überschnappen vermieden. Das Geradebiegen der konkaven Platte darf nicht dazu führen, dass vorgefertigt aufgebrachte Matrixkristallkonglomerate von der Platte abspringen.

- 5 Der Halt am Rande kann beispielsweise durch einen gesonderten Rahmen gegeben werden, der sich an der Unterstruktur festhakt. In der besonders günstigen Ausführungsform nach Abbildung 3 hat die Kunststoffauflage aber einen Halterand in Form einer durchbrochen umlaufenden Randleiste, deren Zungen (2) auf die Seiten- und Stirnflächen der Unterstruktur übergreifen und dort mit erhabenen Kanten in entsprechenden Nuten so einrasten, dass die Auflage
- 10 fest auf die Oberfläche der Unterstruktur gepresst bleibt. Die genaue Form der Randleiste hängt von der Härte und der Elastizität der Kunststoffauflage ab.

Die Randleiste an der Kunststoffplatte kann bei weicheren Kunststoffen auch geschlossen umlaufen; sie kann dann der Kunststoffplatte auch ohne Unterstruktur eine erhöhte Stabilität geben, vorteilhaft für Versand und Handhabung. Besonders in diesem Fall kann die Unterstruktur Durchbohrungen und gegebenenfalls feinste Rillen auf der Oberfläche tragen, um

15 eine gute Evakuierung des Raums zwischen Kunststoffauflage und Unterstruktur zu gewährleisten.

Für die genaue Verfolgung der Proben ist es günstig, wenn Unterstruktur wie auch Kunststoffauflage einen maschinenlesbaren Code tragen, etwa durch einen aufgedruckten Barcode

20 oder einen platzsparenden Punktcode. Da sich ein optisch lesbarer Code auf dem Metall der Unterstruktur schlecht vakuum- und waschfest aufbringen lässt, ist es günstig, hier einen fest eingebauten Transponder zu verwenden. Es gibt sehr einfache Lesestationen für diese Transponder, und sie sind in Gehäusen erhältlich, die vakuum- und waschfest sind. Die Codes der Transponder können damit von Pipettierstationen wie auch von entsprechend ausgerüsteten Massenspektrometern gelesen werden.

25

Der Code im Transponder enthält einen Codeteil, der nur gelesen, aber nicht überschrieben werden kann. Dieser Codeteil kennzeichnet den Probenträger eindeutig. Ein weiterer Teil des Codes ist nicht nur lesbar, sondern auch überschreibbar. Dieser Teil kann Daten aufnehmen, die sich auf die individuellen Eigenschaften der Probenträgerunterstruktur, auf den aktuellen

30 Stand der Bearbeitung der Proben auf dem Probenträger, oder als Zeiger auf Dateien beziehen, in denen die Daten zur Ablaufsteuerung der probenbezogenen Analysenverfahren enthalten sind. Die individuellen Eigenschaften der Unterstruktur können Verschleißdaten, Güteklassen, Justierdaten für den Ort im Massenspektrometer oder ähnliche Daten wie auch einen Benutzungszähler beinhalten. Der aktuelle Stand der Bearbeitung kann die abgeschlossene Belegung, die Zahl der belegten Probenorte, den Stand der nachfolgenden Behandlungsschritte wie

35 Waschen, Rekristallisieren der Matrix, oder der Analysenschritte umfassen. Insbesondere kann eine Adresse für eine Datei enthalten sein, die alle Steuerungsdaten für die Behandlung

und die Analyse enthält, wobei die Analysenverfahren für die einzelnen Proben auf der Probenträgerplatte durchaus voneinander verschieden sein können.

Für die Einweg-Kunststoffauflage lohnt der Einbau eines Transponders nicht. Es kann aber hier wohl während des Herstellungsprozesses eine Individualkennung in Form eines Barcodes oder Punktcodes aufgebracht werden. Da sich – bei Vorhandensein von Transponder-Lesestationen – eine gesonderte Lesestation für diesen Code in allen Behandlungsgeräten nicht lohnt, kann eine Vorrichtung zur Befestigung der Kunststoffauflage auf die Unterstruktur gleichzeitig auch den Code der Kunststoffauflage in den Transponder übertragen.

Enthält die Kunststoffauflage keine eigene Kennung, so besteht ein Zwang zu einer einmaligen Verwendung dieser Kunststoffauflage, wenn die Vorschriften der „Good Laboratory Practice“ (GLP) eingehalten werden sollen. Die einmalige Verwendbarkeit kann durch eine besondere Ausformung der Kunststoffauflage erzwungen werden, beispielsweise durch eine gezielte Zerstörung oder Knickung der Auflage, die ein erneutes Aufbringen auf die Unterstruktur verhindert.

Die Unterstruktur soll so geformt sein, dass ihr Boden sich gut als Deckel für einen darunterliegenden Probenträger eignet. Die belegten Probenträger sind dann stapelbar und können in entsprechenden Behältern für den Nachschub an weitere Behandlungsgeräte, beispielsweise an das Massenspektrometer, zur Verfügung stehen. Die Unterstruktur kann an ihrem Rand besondere Löcher oder Nuten für ein kraftschlüssiges Greifen durch Roboter enthalten. Durch die mechanische Stabilität der Unterstruktur und eine entsprechende Elastizität der Auflage muss sichergestellt werden, dass leichte thermische Belastungen keine Durchbiegung der Gesamtstruktur bewirken.

Die Kunststoffauflage wird bevorzugt aus elektrisch leitfähigem Material gefertigt oder oberflächlich metallisiert, um das Beschleunigungspotential der im MALDI-Prozess gebildeten Ionen gut zu definieren. Kunststoffe mit elektrischer Leitfähigkeit, beispielsweise durch Graphitfüllung, können heute preiswert hergestellt werden.

Wie bereits im Stand der Technik geschildert, ist es vorteilhaft, wenn die Probenträger ein Raster mit hydrophilen Ankern in hydrophober Umgebung tragen. Dieses Raster kann auf Kunststoffen viel einfacher erzeugt werden als auf metallischen Oberflächen. Da sich manchmal die Proben auf der Trägersoberfläche nicht optisch erkennen lassen, ist es zweckmäßig, optisch erkennbare Markierungen mit festem Abstand zum Raster auf die Oberfläche mit aufzubringen. Diese Markierungspunkte können über Videokamera und Mustererkennungssoftware als Orientierungspunkte dienen, um die Proben genau in den Ort des Laserfokus zu bewegen.

Die Kunststoffauflagen bieten eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber dem Stande der Technik. Kunststoffoberflächen können in praktisch jeder Textur und mit jedem Grad der Oberflächenspannung gegenüber Wasser hergetellt werden. Die Herstellung ist preiswert. Die

24

Verwendung von Einweg-Auflagen spart das wiederholte Waschen und hilft gegen den bei Proteinen zu beobachtenden sogenannten Memoryeffekt, besonders wenn an der Grenze zu höchster Empfindlichkeit gearbeitet werden muss. Die Auflagen können bereits vorgefertigt mit Matrixsubstanzen auf den künftigen Probenorten versehen sein und sparen so die Belegungsapparaturen, die Beschaffung genügend sauberer Matrixsubstanzen und deren reproduzierbare Präparation. Die Kunststoffe können insbesondere sehr alkalifrei gehalten werden. Alkaliionen führen zu Addukten, damit zu Verfälschungen der Masse. Sie sind bei Verwendung von metallischen Probenträgern schwer zu unterdrücken.

Die Kunststoffauflagen können leicht in die Rillen von entsprechenden Kunststoffmagazinen eingeschoben werden, in Packungen von je etwa 200 oder 400 Stück. Ein Magazin für 400 Auflagen hat eine Größe von etwa $25 \times 25 \times 12,5$ Zentimetern. Sie können in diesen Magazinen leicht bis zur Verwendung unter Schutzgas gehalten werden. Solche Magazine können von Robotern bestückt und geleert werden.

Auch Raster von kleinen Flecken mit substanzaffinen Schichten können bereits aufgebracht sein. Diese dienen zum Fischen von korrespondierend affinen Proteinen, beispielsweise über Antikörper. Die Proteine können dann gewaschen, eluiert, und auf MALDI-Flecken überführt werden, die sich auf dem gleichen Träger befinden.

Eine Hydrophobisierung der Kunststoffoberfläche kann durch oberflächliche Perfluorierung erzeugt werden. Es gibt jedoch auch andere Arten der Hydrophobisierung, beispielsweise durch Aufbringen und Einbrennen von Perfluoroalkansilikaten.

Ansprüche

1. Probenträger für die massenspektrometrische Analyse von Proben mit Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption,
dadurch gekennzeichnet,
5 dass der Probenträger als Kompositstruktur aufgebaut ist, die aus einer mechanisch sehr festen Unterstruktur hoher Fertigungspräzision und einer abnehmbaren, relativ dünnen Kunststoffauflage mit gleichmäßiger Dicke besteht.
2. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterstruktur durch Abnehmen der Kunststoffauflage wiederverwendbar ist, während die Kunststoffauflage
10 regelmäßig nur einmal verwendet wird.
3. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Kunststoffauflage mit besonderen Halteelementen an der Unterstruktur befestigt wird.
4. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterstruktur Halteelemente besitzt, mit denen die Kunststoffauflage befestigt wird.
- 15 5. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Kunststoffauflage Halteelemente besitzt, mit denen sie an der Unterstruktur befestigt wird.
6. Probenträger nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Kunststoffauflage eine durchgehende oder unterbrochene Randleiste besitzt, mit dem sie die Kante um die Oberfläche der Unterstruktur herum umfasst und in einer dort stirnseitig vorhandenen Nut
20 kraftschlüssig verankert.
7. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kunststoffauflage leicht konkav gewölbt ist, so dass sie nach Aufpressen und Befestigung durch das Halteelement großflächig bündig auf der Oberfläche der Unterstruktur aufliegt.
8. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterstruktur zur Oberfläche hin durchgehende Pumpkanäle besitzt, die die Evakuierung des Zwischenraums zwischen Unterstruktur und Kunststoffauflage erleichtern.
9. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterstruktur eine maschinenlesbare Kennung trägt.
10. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die
30 Kunststoffauflage eine maschinenlesbare Kennung trägt.
11. Probenträger nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Kennung aus einem optisch lesbaren Code besteht.
12. Probenträger nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Kennung in einem Transponder gespeichert ist.

26

13. Probenträger nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Kennung im Transponder einen unveränderlichen Teilcode enthält, der den Probenträger kennzeichnet, und einen veränderlichen Teilcode, der probenträgerbezogene Daten, den aktuellen Belegungs- und Abarbeitungsstatus des Probenträgers und Zeiger auf Dateien mit Daten zur Ablaufsteuerung der probenbezogenen Analysenverfahren enthalten kann.
14. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterstruktur seitlich Löcher oder Nuten zur kraftschlüssigen Aufnahme durch einen Greifroboter enthält.
15. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kunststoffauflage nach dem Abnehmen nicht mehr verwendet werden kann.
16. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die äußere Form des Kompositprobenträgers die Maße einer Mikrotiterplatte besitzt.
17. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kunststoffauflage aus einem elektrisch leitfähigen Material besteht.
18. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kunststoffauflage oberflächlich metallisiert ist.
19. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kunststoffauflage eine hydrophobe Oberfläche besitzt.
20. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kunststoffauflage ein Raster hydrophiler Ankerflächen in jeweils hydrophober Umgebung besitzt.
21. Probenträger nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophilen Ankerflächen aus vorpräparierter Matrixsubstanz bestehen.
22. Probenträger nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Kunststoffauflage optisch erkennbare Markierungspunkte enthält, die in festen Abständen zum Raster der hydrophilen Anker stehen.
23. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenorte der Kunststoffauflage vorgefertigt mit einer Matrixsubstanz belegt sind.
24. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenorte der Kunststoffauflage oder andere Orte auf der Kunststoffauflage chemisch funktionalisiert sind.
25. Probenträger nach einem der bisherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterstruktur Strukturen für den Ansatz von Hilfsmitteln zum Abnehmen der Kunststoffauflage enthält.

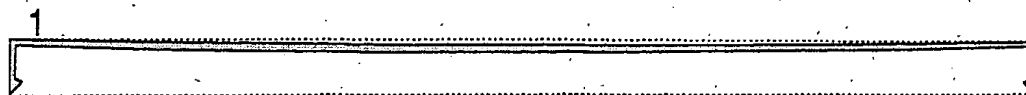


Abbildung 1

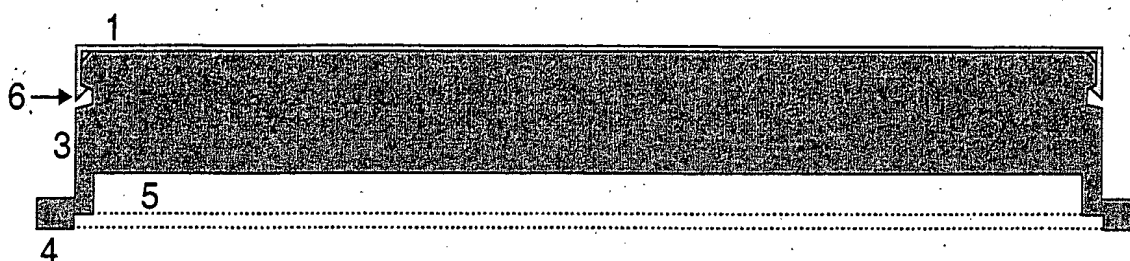


Abbildung 2

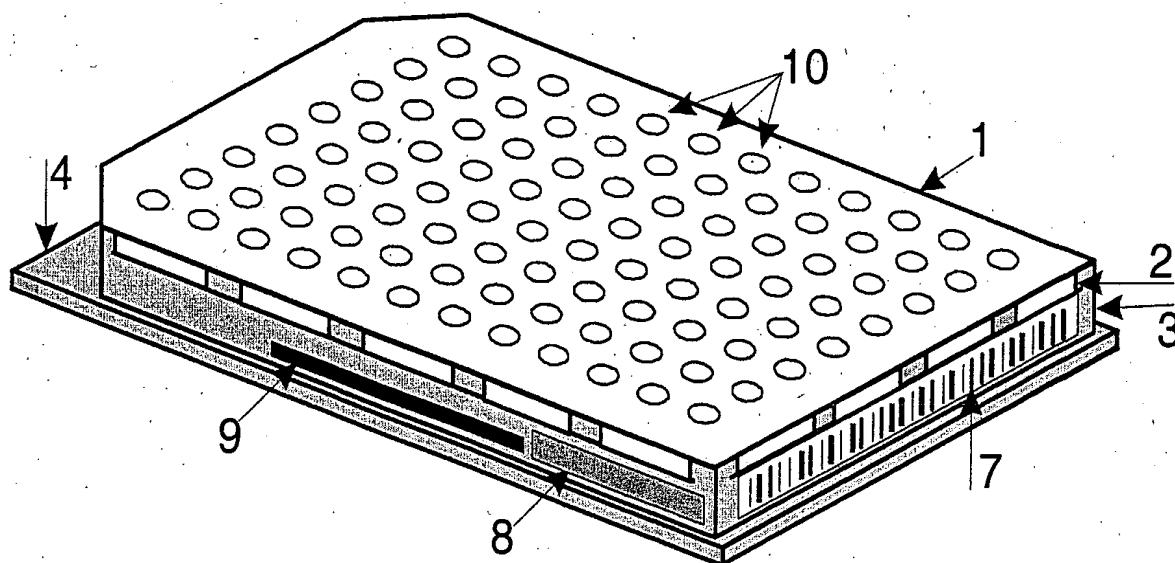


Abbildung 3